



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01304892 A**(43) Date of publication of application: **08.12.89**

(51) Int. Cl

C12P 7/64
/(C12P 7/64 , C12R 1:645 , C12R
1:66 , C12R 1:77 , C12R 1:785 ,
C12R 1:80)

(21) Application number: **63237499**(22) Date of filing: **24.09.88**(30) Priority: **23.02.88 JP 63 38481**(71) Applicant: **SUNTORY LTD**

(72) Inventor: **AKIMOTO KENGO**
SHINMEN YOSHIJI
YAMADA HIDEAKI
SHIMIZU AKIRA

(54) **PRODUCTION OF HIGHLY UNSATURATED**
FATTY ACID ENRICHED FATS AND OILS

(57) Abstract:

PURPOSE: To produce highly unsaturated fatty acid-enriched fats and oils at a low cost by culturing a specific microorganism capable of producing arachidonic acid in a culture medium containing fats and oils as a carbon source and producing fats and oils enriched with highly unsaturated fatty acids.

CONSTITUTION: A microorganism, capable of producing

arachidonic acid and belonging to the genus *Mortierella*, *Conidiobolus*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus* or *Rhodotorula* is cultured in a culture medium containing fats and oils as a carbon source. Fats and oils enriched with highly unsaturated fatty acids are produced by the above-mentioned culture and then recovered. Bishomo- γ -linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, etc., are cited as specific examples of the produced highly unsaturated fatty acids.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A) 平1-304892

⑤ Int. Cl.⁴

C 12 P 7/64
 //(C 12 P 7/64
 C 12 R 1:645
 1:66
 1:77
 1:785
 1:80)

識別記号

庁内整理番号

6926-4B

④ 公開 平成1年(1989)12月8日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全9頁)

⑬ 発明の名称 高度不飽和脂肪酸強化油脂の製造方法

⑭ 特 願 昭63-237499

⑮ 出 願 昭63(1988)9月24日

特許法第30条第1項適用 昭和63年8月25日、日本ビタミン学会発行の「ビタミンVol. 62No. 8」に
 発表

優先権主張 ⑯ 昭63(1988)2月3日 ⑰ 日本(JP) ⑱ 特願 昭63-38481

⑲ 発 明 者	秋 元 健 吾	大阪府三島郡島本町広瀬1-12-22
⑲ 発 明 者	新 免 芳 史	京都府乙訓郡大山崎町円明寺鳥居前8-1 S-304
⑲ 発 明 者	山 田 秀 明	京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1
⑲ 発 明 者	清 水 昌	京都府京都市中京区西ノ京伯楽町14
⑳ 出 願 人	サントリー株式会社	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
㉑ 代 理 人	弁理士 青 木 朗	外4名

明 細 書

脂の製造方法に関する。

1. 発明の名称

高度不飽和脂肪酸強化油脂の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. アラキドン酸を生産することができ、モルティエラ(*Mortierella*)属、コニディオボラス(*Conidiobolus*)属、フィチウム(*Pytyium*)属、フィトフトラ(*Phytophthora*)属、エントモフトラ(*Entomophthora*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、クラドスポリウム(*Cladosporium*)属、ムコール(*Mucor*)属、フザリウム(*Fusarium*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、又はロードトルラ(*Rhodotorula*)属に属する微生物を、油脂を炭素源とする培地で培養することにより高度不飽和脂肪酸が富化された油脂を生成せしめ、それを回収することを特徴とする高度不飽和脂肪酸強化油脂の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は発酵法による高度不飽和脂肪酸強化油

(従来の技術)

今日、生理活性を有する油脂の開発をめざして低級酸油脂、高オレイン酸・高度不飽和油脂あるいは長鎖アルキル油脂等の今までにない脂肪酸組成を有する新規原料油脂の探索が植物を対象として行われたり、また一方では、酵素を利用して新しい構造を有する油脂を製造する等の試みが行われているが、発酵法による新規油脂の製造は知られていない。

(発明が解決しようとする課題)

高度不飽和脂肪酸が強化(富化)された油脂を得るには、油脂に高度不飽和脂肪酸を添加する方法、主原料としての油脂を高度不飽和脂肪酸の含有率が高い強化用油脂と混合する方法が考えられるが、前記の場合高度不飽和脂肪酸が高価であるため強化された油脂製品が高価なものとなり、又後者の場合には一般にかなり高比率で強化用油脂を混合

しなければならず、その結果強化された油脂製品の脂肪酸組成等の性質が主原料としての油脂に比べて大きく異なるものとなる等の問題点がある。

従って、本発明は、高度不飽和脂肪酸が強化されており、この点を除けば主原料としての油脂の脂肪酸組成が概ね維持されている高度不飽和脂肪酸強化油脂を安価に製造することができる方法を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者等は、上記の課題を解決するため種々研究した結果、高度不飽和脂肪酸を生産することができる微生物を、油脂を主な炭素源として含有する培地中で培養した場合該油脂が部分的に高度不飽和脂肪酸又は高度不飽和脂肪酸を含有する脂質に転換され、これらを全体として回収すれば、高度不飽和脂肪酸が強化されており、この点を除けば原料油脂の脂肪酸組成が概ね維持されている新たな油脂が得られることを見出した。

従って本発明は、アラキドン酸を生産すること

ができ、モルティエラ(*Mortierella*)属、コニディオボラス(*Conidiobolus*)属、フィチウム(*Pythium*)属、フィトフトラ(*Phytophthora*)属、エントモフトラ(*Entomophthora*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、クラドスポリウム(*Cladosporium*)属、ムコール(*Mucor*)属、フザリウム(*Fusarium*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、又はロードトルラ(*Rhodotorula*)属に属する微生物を、油脂を炭素源とする培地で培養することにより高度不飽和脂肪酸が高化された油脂を生成せしめ、それを回収することを特徴とする高度不飽和脂肪酸強化油脂の製造方法を提供するものである。

〔具体的な説明〕

本発明においては、アラキドン酸生産能を有し油脂を炭素源に高度不飽和脂肪酸を生産することができる微生物であれば、すべて使用することができる。このような微生物として例えばモルティエラ(*Mortierella*)属、コニディオボラス

(*Conidiobolus*)属、フィチウム(*Pythium*)属、フィトフトラ(*Phytophthora*)属、エントモフトラ(*Entomophthora*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、クラドスポリウム(*Cladosporium*)属、ムコール(*Mucor*)属、フザリウム(*Fusarium*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、ロードトルラ(*Rhodotorula*)属を挙げることができる。

モルティエラ属では例えば、モルティエラ・エロンガタ(*Mortierella elongata*) IF0 8570、モルティエラ・エキシグア(*Mortierella exigua*) IF0 8571、モルティエラ・ヒグロフィラ(*Mortierella hygrophila*) IF0 5941、モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) IF0 8568等を挙げることができる。これらの菌株はいずれも、財団法人醸酵研究所からなんら制限なく入手することができる。

また、本発明者らが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ SAM 0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号)を使用することもできる。

さらに、他の属に属する微生物の具体例として、コニディオボラス・ヘテロスボラス(*Conidiobolus heterosporus*) CBS 138.57、フィチウム・イレグラレ(*Pythium irregulare*) CBS 494.86、フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*) IF0 4872、エントモフトラ・イグノビリス(*Entomophthora ignobilis*) CBS 181.60、ペニシリウム・シアネウム(*Penicillium cyaneum*) IF0 5337、クラドスポリウム・ヘルブラム(*Cladosporium herbarum*) IF0 30314、ムコール・アンビガス(*Mucor ambiguus*) IF0 6742、フザリウム・オキソボラム(*Fusarium oxysporum*) IF0 5942、アスペルギルス・カンディダス(*Aspergillus candidus*) IF0 8816、ロードトルラ・グラチニス(*Rhodotorula glutinis*) IF0 0695等を挙げることができる。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。炭素源となる油脂としては、液体培地の場合、例えば梅油、ヒマシ油、クロロフィル油、ト

ウモロコシ油、綿実油、クロトン油、亜麻仁油、オリーブ油、落花生油、菜種油、胡麻油、大豆油、桐油、鯨油、ヤシ油等を使用することができる。これらの油脂は単独で用いてもかまわないし、いくつかの油脂と組み合わせてもよい。

前記油脂を炭素源として培養した場合、生産される高度不飽和脂肪酸としては、ビスホモアーリノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸等が挙げられ、使用する油脂によってその生成比は異なる。例えば、胡麻油・落花生油を用いた場合、あるいは別の油に胡麻油・落花生油を加えたものを使用した場合にはアラキドン酸の他にビスホモアーリノレン酸が強化される。又、 α -リノレン酸を含有する油脂、例えば亜麻仁油・菜種油等を使用した場合、あるいは別の油に α -リノレン酸を含有する油脂を加えたものを使用した場合には、アラキドン酸の他にエイコサペンタエン酸が強化される。さらに、油の他にリグナン誘導体、例えばセサミン、エビセサミン、セサミノール、エビセサミノール、セサモリン等を添加し

た場合には、アラキドン酸の他にビスホモアーリノレン酸が強化される。

実用上一般に、炭素源としての油脂は0.5~10重量%、好ましくは1~5重量%、培地にはさらに、菌の生育を助ける目的で少量のグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されるものが、いずれも使用できる。これらの濃度は一般に1重量%以下、好ましくは0.5重量%以下である。

窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティプリカー等の天然窒素源、尿素等の有機窒素源、あるいは硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の有機窒素源を単独で、又は組み合わせて用いることができる。窒素源の量はその種類により異なる、0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのが良い。

ビスホモアーリノレン酸を強化する目的で加えるリグナン誘導体、例えばセサミン、エビセサ

ミン、セサミノール、エビセサミノール、セサモリン等の場合、総添加量は培地に対して $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-1}$ 重量%である。

この他に必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。

培養温度は5~40℃、好ましくは20~30℃とする。又特にエイコサペンタエン酸を強化したい場合は、培養開始時より、又は最適生育温度で培養した後に最適生育温度以下の温度で培養することもできる。あるいは、最適生育温度以下の温度で培養した後、場合によっては菌体を集め、さらに最適生育温度以下の温度に静置することもできる。この場合、培養温度を5~40℃、好ましくは10~20℃とするか、又は20~30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後、10~20℃にて培養を続ける。あるいは、10~20℃にて培養を続け、菌体を十分増殖せしめた後、場合によっては集菌し、さ

らに10~20℃にて湿菌体の状態で静置する。低温での培養又は静置はアラキドン酸および α -リノレン酸からエイコサペンタエン酸への交換を促進するため、先述したように炭素源として α -リノレン酸を含有する油脂を使用した場合には、エイコサペンタエン酸がさらに強化される。培地のpHは、4~10、好ましくは6~9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2~10日間行う。

固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50~100重量%の水を加えたふすま、もみぐら、米ぬか等を用い、油脂を1~10重量%、好ましくは1~5重量%加える。5~40℃、好ましくは20~30℃の温度において、3~14日間培養を行う。又培養開始時より、又は最適生育温度で培養した後に最適生育温度以下の温度で培養してエイコサペンタエン酸を生産せしめても良い。又必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。

培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の

常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高度不飽和脂肪酸を強化した油脂が得られる。

又、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。メタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1

グルコース 2%、グルコース 1%と亜麻仁油 1%、グルコース 0.5%と亜麻仁油 1.5%、グルコース 0.2%と亜麻仁油 1.8%、亜麻仁油 2%、グルコース 0.5%と亜麻仁油 1%、グルコース 0.5%と亜麻仁油 2%、又はグルコース 0.5%と亜麻仁油 3%、の 8 種の組成にさらに酵母エキス 1%を含む培地 (pH 6.0) 10 ml を 50 ml のマイヤーフラスコに入れ 120℃で 20 分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ IF0 8568 の孢子液 400 μ l を、それぞれの培地に加えレシプロシェーカー (110 rpm) により 28℃で 6 日間振盪培養した。

培養後、濾過により菌体を回収し十分水洗した後、凍結乾燥し、上記のそれぞれの組成に対して乾燥菌体 117.6, 178.0, 211.9, 239.1, 222.8, 164.4, 273.2, 376.6 mg を得た。この菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いる Bligh & Dyer の抽出法によって油脂を抽出した所、それぞれ 35.0, 87.0, 114.2, 136.0, 125.9, 77.8, 173.3, 272.0 mg の油脂が得られた。

油脂の含有物を確認するためこの油質の一部をねじ口試験官に入れ、油脂 50 mg に対して少なくとも無水メタノール-塩酸 (10%) を 2 ml 加えキップした後、50℃で 3 時間処理することによってメチルエステル化し、n-ヘキサン 4 ml、水 1 ml を加え、2 回抽出し溶媒を遠心エバポレーター (40℃、1 時間) で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。その結果を第 1 表に示す。

以下余白

第 1 表

培地中炭素源		生成物の分析値										
		乾燥菌体 量 (mg)	油脂重量 (mg)	脂 肪 酸 組 成								
				16:0 (%)	18:0 (%)	18:1 (%)	18:2 (%)	18:3 γ (%)	18:3 α (%)	20:3 (%)	20:4 (%)	20:5 (%)
グルコース (%)	亜麻仁油 (%)											
2	0	117.6	35.0	11.9	7.7	9.6	6.1	4.8	6.8	7.3	51.8	—
1	1	178.0	87.0	8.5	3.1	13.3	13.5	0.8	46.5	1.3	9.3	5.7
0.5	1.5	211.9	114.2	5.7	2.7	14.3	14.5	—	52.7	0.5	5.1	4.5
0.2	1.8	239.1	136.0	6.0	2.4	14.1	14.9	—	53.2	0.6	4.5	4.3
0	2	222.8	125.9	5.9	2.5	14.7	15.1	—	53.7	0.5	3.7	3.9
0.5	1	164.4	77.8	6.1	2.2	14.1	14.0	0.7	47.2	0.9	7.9	6.9
0.5	2	273.2	173.3	5.5	2.9	12.7	14.3	0.6	51.6	0.8	6.3	5.3
0.5	3	376.6	272.0	5.8	2.2	14.2	15.6	—	55.9	—	—	—
亜 麻 仁 油		—	—	4.9	3.0	15.7	17.5	—	58.9	—	—	—

注：脂肪酸の表示において、16:0はパルミチン酸、18:0はステアリン酸、18:1はオレイン酸、
18:2はリノール酸、18:3 γ は γ -リノレン酸、18:3 α は α -リノレン酸、20:3はビスホモ γ -リノレン酸、
20:4はアラキドン酸、20:5はエイコサペンタエンを示す。

第1表から明らかな様に、亜麻仁油だけを炭素源とした場合でも菌は生育しビスホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸を亜麻仁油に強化した。そして、これら高度不飽和脂肪酸以外の脂肪酸組成は亜麻仁油本来の脂肪酸組成と比較しても大きな違いは認められず、このことから、融点のような物理的性質を変化させずに、高度不飽和脂肪酸を強化した栄養価の高い油脂を得ることができることがわかった。又、菌の生育を助ける目的でグルコースを加える場合、油脂が2%以上の場合、グルコースが0.5%以下なら脂肪酸組成に大きな影響を及ぼさなかった。なお、得られたビスホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸についてはすでに質量分析、NMR分析等により同定されている。

実施例2

椿油2%、ヒマシ油2%、トウモロコシ油2%、綿実油2%、クロトン油2%、亜麻仁油2%、オリブ油2%、落花生油2%、菜種油2%、胡麻油2%、大豆油2%又は月見草油2%のいずれかと

グルコース0.5%及び酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0)2mlを10mlのマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568の胞子液100 μ lをそれぞれの培地に加え、レシアロシェーカー(110rpm)により28℃で6日間振盪培養した。

培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、抽出を行い、油脂31.7, 24.3, 31.3, 31.8, 25.2, 30.2, 28.8, 28.6, 29.3, 28.8, 26.5, 28.0mgを得た。次に実施例1と同様に加水分解、メチルエステル化、抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。この結果を第2表に示す。

以下余白

第2表

培地中の 油脂の種類	生成物の分析				
	乾燥菌 体重量 (mg)	油 脂 重 量 (mg)	脂 肪 酸		
			20:3 (%)	20:4 (%)	20:5 (%)
椿 油	49.3	31.7	0.8	12.6	—
ヒマシ油	54.0	24.3	2.9	30.6	—
トウモロコシ油	53.0	31.3	1.5	15.0	—
綿実油	47.2	31.8	1.4	15.3	—
クロトン油	51.9	25.2	2.1	20.2	0.2
亜麻仁油	51.4	30.2	0.8	6.3	5.3
オリーブ油	54.4	28.8	1.6	18.7	0.1
落花生油	54.9	28.6	4.4	19.6	—
菜種油	54.9	29.3	1.5	18.4	1.1
胡麻油	50.1	28.8	8.5	3.1	—
大豆油	56.6	26.5	1.9	18.1	0.1
月見草油	56.9	28.0	2.0	19.4	—

注1. 原料油脂はいずれも表示した高度不飽和脂肪酸を含有しない。

2. 脂肪酸の表示において、20:3はビス

ホモ- α -リノレン酸、20:4はアラキドン酸、20:5はエイコサペンタエン酸をそれぞれ示す。

第2表から明らかな通り、いずれの油脂を培地に添加しても高度不飽和脂肪酸が油脂に強化されることが認められた。又、 α -リノレン酸を含有するクロトン油、亜麻仁油、オリーブ油、菜種油、大豆油ではエイコサペンタエン酸の油脂への強化が認められ、その量は α -リノレン酸の含有量に依存した。そして、胡麻油・落花生油の場合、ビスホモ- α -リノレン酸の油脂への強化が強く認められた。

実施例3

グルコース 0.5%、オリーブ油2%及び酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0) 20mlを100mlのマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568の胞子液1mlを培地に加え、レシアロシェーカー(110rpm)により12℃で10日間振盪培養した。

培養後、菌体を集め、実施例1に記載したのと

同様に水洗・乾燥及び抽出を行い、油脂0.24gを得た。次に、実施例1と同様に、加水分解、メチルエステル化、及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、エイコサペンタエン酸が2%含まれており、低温培養によりエイコサペンタエン酸が油脂に強化されることが認められた。

実施例4

グルコース 0.5%、オリーブ油2%、酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0) 100mlを500mlマイヤーフラスコに入れ120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568及びコニディオボラス・ヘテロスポラスCBS 138.57の胞子液をそれぞれ別個に培地に1ml加え、レシアロシェーカー(110rpm)により28℃で7日間振盪培養した。培養後、濾過にて菌体を回収し、十分洗浄した後、凍結乾燥した。これにより、モルティエラ・アルビナ、コニディオボラス・ヘテロスポラスの乾燥菌体をそれぞれ2.7g、3.2g得た。この菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶

媒を用いるBligh & Dyerの抽出法によって総脂質を抽出した所、それぞれ1.2g、1.5gの脂質が得られた。この脂質を実施例1と同様に加水分解、メチルエステル化、抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した所、アラキドン酸がそれぞれ14.1%、10.3%含まれており、抽出した油脂に高度不飽和脂肪酸が強化されることが認められた。

実施例5

亜麻仁油 0.5%、亜麻仁油1%、菜種油 0.5%又は菜種油1%の4種の組成と、グルコース2%、ゴマ油2%、酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0)

または亜麻仁油エステル1%、セサミン0.01%、グルコース2%及び酵母エキス1%を含む培地

(pH 6.0) 各々

2mlを10mlマイヤーフラスコに入れ120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568の胞子液をそれぞれ別個に培地に100ml加え、レシアロシェーカー(110rpm)により28℃で7日間振盪培養した。

培養後、実施例1と同様にろ過、水洗、乾燥、抽出を行い、油脂52.4mg、58.7mg、51.6mg、55.2mgを得た。次に実施例1と同様に加水分解、メチルエステル化、抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。この結果を第3表に示す。

第3表

培地中の油脂の組成	生成物の分析				
	乾燥固 体重量 (mg)	油脂 重量 (mg)	脂 肪 酸		
			20:3 (%)	20:4 (%)	20:5 (%)
ゴマ油2%+亜麻仁油0.5%	60.9	52.4	2	1.4	0.07
ゴマ油2%+亜麻仁油1%	78.4	58.7	3.1	2.3	0.2
ゴマ油2%+菜種油0.5%	71.6	51.6	2.4	2.0	tr.
ゴマ油2%+菜種油1%	76.7	55.2	3.4	2.4	0.05
セサミン0.01%+亜麻仁油エステル1%	31.5	12.0	9.2	17.9*	3.5

注：脂肪酸の表示において、20:3はビスホモマー
ーリノレン酸、20:4はアラキドン酸、20:5は

エイコサペンタン酸をそれぞれ示す。但し、
*を付した数値は、20:4_{n-3}であるアラキドン酸13.8%と20:4_{n-2}である化合物4.1%との合計を示し、ここでn-3及びn-6はそれぞれメチル末端から数えて最初の二重結合の位置を示す。

実施例6

グルコース 0.5%、オリーブ油2%及び酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0)2mlを10mlのマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。フィチウム・イレグラレ(*Pythium irregulare*)

以下余白

CBS 494.86、フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*) IFO 4872、エントモフトラ・イグノビリス(*Entomophthora ignobilis*) CBS 181.60、ペニシリウム・シアネウム(*Penicillium cyaneum*) IFO 5337、クラドスポリウム・ヘルブラム(*Cladosporium herbarum*) IFO 30314、ムコール・アンビガス(*Mucorambiguus*) IFO 6742、フザリウム・オキシボラム(*Fusarium oxysporum*) IFO 5942、アスペルギルス・カンディダス(*Aspergillus candidus*) IFO 8816、ロードトルラ・グラチニス(*Rhodotorula glutinis*) IFO 0695を培地に1白金耳を接種し、レシアロシェーカー(110rpm)により28℃で7日間振盪培養した。培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、抽出を行い、油脂11.6mg、7.8mg、14.0mg、14.7mg、19.4mg、14.7mg、12.8mg、13.6mg、13.7mgを得た。次に実施例1と同様に加水分解、メチルエステル化、抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。この結果を第4表に示す。

実施例7

グルコース 0.5%、オリーブ油2%及び酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0)、グルコース 0.5%、オリーブ油2%、酵母エキス1%及びセサミン 0.2mgを含む培地(pH 6.0)2mlを10mlのマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) IFO 8568の胞子液 100μlをそれぞれの培地に加え、レシアロシェーカー(110rpm)により28℃で6日間振盪培養した。

培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、抽出を行い、油脂31.8mg、28.2mgを得た。次に実施例1と同様に加水分解、メチルエステル化抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。この結果、セサミンを添加することによりビスホモマーリノレン酸の割合が1.0%から4.9%に上った。

第4表

アラキドン酸生産菌	生成物の分析		
	乾燥菌 体重量 (mg)	油脂 重量 (mg)	アラキ ドン酸 (%)
フィチウム・イレグラレ	36.2	11.6	0.2
フィトフトラ・インフェスタンス	29.3	7.8	0.2
エントモフトラ・イグノビリス	38.3	14.0	0.5
ベニシリウム・シアネウム	38.2	14.7	0.3
クラドスポリウム・ヘルブラム	50.9	19.4	0.2
ムコール・アンビガス	35.9	14.7	0.2
フザリウム・オキソボラム	29.7	12.8	0.1
アスペルギルス・カンディダス	36.0	13.6	0.3
ロードトルラ・グラチニス	34.1	13.7	1.0

実施例8

グルコース 2.0%、酵母エキス 1.0%、及び0、1.0、2.0又は 3.0%の亜麻仁油メチルエステルを含む培地(pH 6.0)各6mlを30mlマイヤーフラス

コに入れ、そして 120℃で 20 分間殺菌した。モルティエレラ・ベルジャコバエ(*M. beljakovae*) CBS601.68の胞子液 200μl を培地に加え、レシアロシェーカー(110 rpm)により、亜麻仁油メチルエステル無添加の場合は 12℃で 7 日間、0.7%添加の場合は 12℃で 10 日間または 28℃で 6 日間振盪培養した後菌体を集め、実施例 1 に記載したのと同様にして水洗、乾燥及び抽出を行い油脂を 4.9mg、7.3mg、21.5mg 得た。

次に実施例 1 と同様にして加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。その結果アラキドン酸及びエイコサペンタエン酸がそれぞれ 25.4%及び検出不可能量、8.7%及び 4.9%、4.8%及び 0.7%含まれており、アラキドン酸からエイコサペンタエン酸への変換の経路を持たない菌を使用すればα-リノレン酸の添加および低温培養により、アラキドン酸とエイコサペンタエン酸が共に強化されることが認められた。

コに入れ、そして 120℃で 20 分間殺菌した。モルティエレラ・アルビナ IF0 8568 の胞子液 600μl を培地に加え、レシアロシェーカー(110rpm)により 12℃で 9 日間振盪培養した後菌体を集め、湿菌体の状態で 12℃で 7 日間静置した。静置後、菌体を集め、実施例 1 に記載したのと同様にして水洗、乾燥及び抽出を行い、油脂をそれぞれ 12.5mg、39.3mg、72.4mg、及び 103.0mg 得た。

次に、実施例 1 と同様にして、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。その結果、エイコサペンタエン酸が 6.8%、19.0%、12.1%、12.0%含まれており、α-リノレン酸の添加および低温培養-低温静置によりエイコサペンタエン酸が油脂に強化されることが認められた。

実施例9

グルコース 2.0%、酵母エキス 1%、及び0又は 0.7%の亜麻仁油メチルエステルを含む培地(pH 6.0)各2mlを10mlマイヤーフラスコに入れ、

手続補正書(自発)

昭和63年 11 月 26 日



特許庁長官 吉田文毅 殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第237499号

2. 発明の名称

高度不飽和脂肪酸強化油脂の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (190)サントリー株式会社

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579) 青木 朗

 印 弁理士
(外4名)

特許庁

5. 補正の対象

- (1) 明細書の「特許請求の範囲」の個
- (2) 明細書の「発明の詳細な説明」の個

6. 補正の内容

~~特許請求の範囲を~~

- (1) 別紙のとおりに補正する。
- (2) 明細書第27頁第8～9行目「4.9 mg、7.3 mg、21.5 mg」を「1.0 mg、1.5 mg、4.3 mg」に補正する。

7. 添付書類の目録

特許請求の範囲

1 通

2. 特許請求の範囲

1. アラキドン酸を生産することができ、モルティエラ(*Mortierella*) 属、コニディオボラス(*Conidiobolus*) 属、フィチウム(*Pythium*) 属、フィトフトラ(*Phytophthora*) 属、エントモフトラ(*Entomophthora*) 属、ペニシリウム(*Penicillium*) 属、クラドスポリウム(*Cladosporium*) 属、ムコール(*Mucor*) 属、フザリウム(*Fusarium*) 属、アスペルギルス(*Aspergillus*) 属、又はロードトルラ(*Rhodotorula*) 属に属する微生物を、油脂を炭素源とする培地で培養することにより高度不飽和脂肪酸が富化された油脂を生成せしめ、それを回収することを特徴とする高度不飽和脂肪酸強化油脂の製造方法。